

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

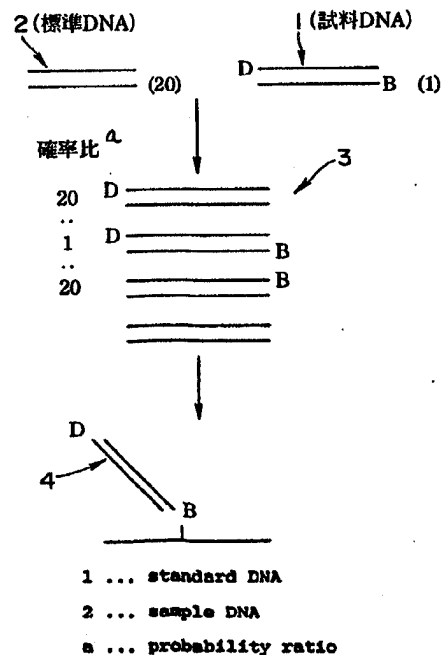
(51) 国際特許分類 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/02068  (43) 国際公開日 1995年1月19日 (19.01.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01106 (22) 国際出願日 1994年7月7日 (07. 07. 94) (30) 優先権データ 特願平5/194196 1993年7月9日 (09. 07. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 湧永製薬株式会社 (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) (JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区伏見町4丁目2番14号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡 孝紀 (OKA, Takanori) (JP/JP) 松永裕也 (MATSUNAGA, Hironari) (JP/JP) 山根明男 (YAMANE, Akio) (JP/JP) 〒739-11 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 Hiroshima, (JP) (74) 代理人 弁理士 小島隆司 (KOJIMA, Takashi) 〒104 東京都中央区銀座2丁目13番19号 銀座森澤ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title METHOD OF DISCRIMINATING NUCLEIC ACID AND TESTING SET FOR DISCRIMINATING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称 核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セット

## (57) Abstract

A method of discriminating nucleic acids by examining the presence or absence of variant genes in a nucleic acid, the ratio of normal genes to variant genes, or the identity among specified genes present in various samples, which method comprises amplifying a specified region of a target nucleic acid present in a specimen by the polymerase chain reaction using a primer bearing a detectable marker and a primer bearing a site capable of binding to a solid-phase carrier, conducting competitive hybridization by adding the resultant nucleic acid as a marker sample DNA in at least an equimolar amount to a non-marker standard DNA of which the identity with the sample DNA is to be discriminated, and then measuring the marker intensity of the product of hybridization. A testing set for discriminating nucleic acids according to the above method comprises a primer to be used for amplifying a target nucleic acid and comprising a primer bearing a detectable marker and a primer bearing a site capable of binding to a solid-phase carrier, and a non-marker standard DNA of which the identity with a gene amplified by the amplifying primer is to be discriminated.



(57) 要約

検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとを用い、PCR法にて検体中の目的核酸の特定領域の増幅を行ない、これを標識試料DNAとして該試料DNAとの同一性を識別したい非標識標準DNAに等モル以上加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、反応終了後、ハイブリダイゼーション生成物の標識強度を測定することにより、核酸中の変異遺伝子の有無、正常遺伝子と変異遺伝子との比、あるいは複数の試料中の特定遺伝子の同一性を調べる核酸の識別方法を提供する。

また、この識別方法により核酸を識別する為の核酸の識別用検査セットとして、検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーと、該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識DNA標品とを具備する核酸の識別用検査セットを提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LT	リトアニア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LR	リベリア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナジン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダードトバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	KE	ケニア	NE	ニジェール	US	米国
CM	コモロ	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

## 明 細 書

## 核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セット

## 技術分野

5 本発明は、核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セット  
に関し、更に詳述すると、核酸中の変異遺伝子の有無並び  
に正常遺伝子と変異遺伝子との比を検体から直接、短時間  
で検出することができ、従来検出が困難とされていた、遺  
10 伝子内の不特定位置に存在する変異の検出や正常細胞中に  
混在する変異遺伝子を持った少量の異常細胞の検出あるい  
は複数の試料中の特定遺伝子の同一性を調べることが可能  
な核酸の識別方法及び該方法により核酸の識別を行なうた  
めの核酸の識別用検査セットに関する。

## 背景技術

15 近年、分子生物学、遺伝学の発展は著しく、これらの蓄  
積された成果は生命現象の化学的／物理的解明に寄与する  
のみならず、人間に対して、特に医学や医療に対しても大  
きな影響を与え、DNA から出発する DNA 医学が予想を遥  
かにこえて、臨床分野にまで大きく進みつつある。最近で  
20 は、殆ど全ての疾患が DNA に関係しているということがわ  
かってきており、遺伝子レベルでの診断は必要不可欠なも  
のとなりつつある。

今日、遺伝子疾患（分子病）と総称される疾患には、先  
天性代謝異常症として古くから知られていた数多くの酵素  
25 欠損症が殆ど全て該当するということが分かっており、こ

れら遺伝子疾患の診断には、遺伝子上の変異を検出することが極めて有効である。

従来、遺伝子上の変異を検出する方法としては、遺伝子変異の位置が分かっている場合には、オリゴヌクレオチド  
5 プローブを用いる検出方法 (PNAS, 80, 278 (1983)) や制限酵素多型性を利用する方法 (Am. J. Hum. Genet., 69 201 (1980))、リボヌクレアーゼを利用して RNA : DNA ハイブリッド中の一塩基ミスマッチを切断する方法 (Science 230, 1243 (1985)) 等がある。

10 また、遺伝子増幅法を利用する変異の検出法も開発されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 189 (1991), Anal. Biochem. 186, 64 - 68 (1990))。しかしながら、これらの方法は、塩基配列が既知で、しかも特定の変異の検出に限られている。一方、ある領域内の不特定な変異 (位  
15 置、塩基) を検出する方法としては、SSCP 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2766 (1989))、DGGE 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 232 (1989)) 等が報告されているが、これらの方法は電気泳動法を利用しており、操作性や迅速性を考えると必ずしも実用的でない。

20 そこで、ニコラス (J. C. Nicolas) らは核酸のある領域内の不特定の変異を検出する系として以下のような方法を開発した (ヨーロッパ公開 362042 号、Anal. Biochem. 205, 193 (1992))。まず、変異を検出しようとする領域を含む核酸断片の二本鎖の一方にビオチン標識を導入し、他  
25 方に FITC 標識を導入して標識標準 DNA とし、これに標準

DNAと同じ領域の非標識の核酸断片を含む試料DNAを過剰量添加混合して加熱変性させた後、徐々に温度を下げる（コンペティティブハイブリダイゼーション）。これにより、試料中に標識標準DNAと全く同じ塩基配列を含む断片が存在する場合には、標識標準DNAの二本鎖と試料DNA中の二本鎖との間に組み換えが起こり、最初に存在したビオチン標識とFITC標識の両方を持つ標識標準DNAの量が減少する。一方、試料中に標識標準DNAと一部異なる塩基配列を含む断片が存在する場合には、先のような標識標準DNAの二本鎖と試料DNA中の二本鎖の間で組み換えは起こりにくく、よって最初に存在した標識標準DNA量はほとんど変化しない。つまり、一連の混合、変性、アニーリング（コンペティティブハイブリダイゼーション）の操作の後、最初に加えた標識標準DNA量の変化を見ることで、標識標準DNAと同じ塩基配列を含む断片が存在するか否かを判定する方法である。

ここで、一般に先天的な遺伝性疾患の場合には、優性遺伝するものと劣性遺伝するものとがある。前者は遺伝子の異常が対立遺伝子の一方にのみ存在する場合（ヘテロ）でもその発現型を示し、後者はその異常が対立遺伝子の両方に存在する場合（ホモ）にのみ発現型を示すものである。上記劣性遺伝の場合、遺伝子の異常が対立遺伝子の一方のみに存在するときには、その遺伝子異常は疾病となって表れるわけではないが、その子孫がその遺伝子を受け継ぐ可能性は高い。従って、ホモ或いはヘテロにかかわらずなく、そ

の遺伝子異常を調べることは重要な意義がある。また、ヒト白血球抗原（HLA）のタイピングにおいては、試料の対立遺伝子がホモと判定されても、従来法では本当にホモであるかどうかを正確に判断することができず、その確認方法の確立が望まれている。

更に、後天的な遺伝子の異常によって生じる疾患、即ちガン等の遺伝子診断を行う場合、ガン病片からガン細胞のみを集めることは非常に困難であり、常に正常細胞が混入する。このように、正常細胞と変異細胞とが混在する状況下で、変異細胞中の変異遺伝子を検出することは、ガン等の後天的な遺伝子疾患の診断において、非常に意義深いことである。

しかしながら、上記ニコラスらの方法においては、正常遺伝子と変異遺伝子とが混在している場合、変異遺伝子を正確に検出することは困難である。例えば、正常な遺伝子を含む核酸断片を標識標準DNAとして使用すると、試料中の核酸の当該遺伝子の1/2が正常遺伝子（ヘテロ）である場合と、すべてが正常遺伝子である場合（正常でホモ）とで、結果として得られるシグナルに顕著な差が見られない。従って、上述した遺伝子の変異による疾病の診断においてはこれらの方法では不十分である。

従って、遺伝病の診断等に有効かつ実用的な核酸の識別方法の開発が望まれている。

#### 発明の開示

本発明は、遺伝子領域の不特定の変異の有無のみならず、

その変異が対立遺伝子の両方に起きているのか、或いは一方のみに起きているのかを検出することができ、また正常細胞中に混在するわずかな変異も検出可能であると共に、その存在比をも測定可能あり、かつ複数の検体間でその特定の対立遺伝子が完全に一致しているか否かを確認することが可能な核酸の識別方法、及び、該識別方法の実施に使用される核酸の識別用検査セットを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記目的を達成するため、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸を用いた目的核酸検出システム（ED-PCR法；特開平1-314965号、同1-252300号公報、J.Clin.Microbiol.30,1728（1992）等参照）を利用して以下の実験を行い、鋭意検討を行った。

まず、変異遺伝子を含むと考えられる試料DNAを上記二種の標識したプライマーで遺伝子増幅反応を行って標識試料DNAとし、一方変異のない正常遺伝子を上記プライマーと同じ塩基配列でかつ標識のないプライマーで遺伝子増幅反応を行って非標識標準DNAとした。次に、上記標識試料DNAに上記非標識標準DNAを等モル以上加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、標識試料DNAと非標識標準DNAとの組み換え率をED-PCR法のシステムを利用して測定した。その結果、標識試料DNAに対して等モル以上の非標識標準DNAを加えることによって、ある遺伝子領域の不特定の変異のみならず、その変異が対立遺

伝子の両方に起きているのか、或いは一方のみに起きているのかを検出することができ、更には変異遺伝子の存在比率が10%程度でも検出することができ、しかもその存在比をも測定できることが明らかになった。また、この方法を用いると2つの検体DNA中の特定遺伝子に関して一方を標識試料DNA、他方を非標識標準DNAとすることにより、これら遺伝子の同一性、即ちこれら遺伝子が互いに同一であるのか或いは完全に異なっているのか又は部分的に異なっているのか、更にはどの程度異なっているのかを調べることが可能であることを見出し、本発明を完成するに至ったものである。

即ち、本発明者らは、従来法においては、標識した標準DNAに非標識の試料DNAを過剰に加え、コンペティティブハイブリダイゼーションするのに対し、これとは逆に標識した試料DNAに非標識の標準DNAを過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションすることにより、後述するように正常遺伝子と変異遺伝子との存在比に関係なく変異の有無を検出することができること、また試料中に存在する正常遺伝子と変異遺伝子との比と、コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じる固相担体に結合可能な標識物と検出可能な標識物との両方を持つ分子を定量した測定値との間に比例的相関関係が得られ、上記測定値から、それらの存在比を比較的容易に算出することができること、更には複数の検体DNAの特定遺伝子に関して、それぞれ標識試料DNA、非標識標準DNAとすることによ



り、これら遺伝子の同一性を調べることも可能であることを見出し、本発明を完成したものである。

従って、本発明は検体中の目的核酸の特定領域内の遺伝子を識別するに当たり、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用のプライマーを用いて、検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子増幅を行ない、その結果得られた標識DNAを試料DNAとすると共に、この試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品を標準DNAとし、上記試料DNAに上記標準DNAを等モル以上加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行なった後、上記検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とを利用して上記試料DNAと上記標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することによって、核酸の同一性を識別することを特徴とする核酸の識別方法を提供する。

また、本発明は、上記本発明の識別方法により核酸を識別する為の核酸の識別用検査セットとして、検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーと、該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識DNA標品とを具備してなることを特徴とする核酸の識別用検査セットを提供する。

ここで、本発明の核酸の識別用検査セットは、目的核酸内の特定領域内の核酸の増幅用プライマーと、必要に応じて細胞破壊処理等の前処理を施した検体とを混合し、これ

に核酸の増幅を行なうための試薬を添加して、検体中の目的核酸の増幅を行ない、これに上記非標識DNA標品を加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行なった後、得られたハイブリダイゼーション生成物を固相担体に結合可能な部位を利用して担体にトラップし、検出可能な標識  
5 を利用して測定するものであり、この場合上記核酸増幅用プライマー及び非標識DNA標品に、更に細胞破壊試薬、核酸増幅を行なうための試薬、ハイブリダイゼーション生成物をトラップするための担体等のED-PCR法に用いられるものと同様の試薬や部材を加えて、核酸の識別用検査セ  
10 ャットとすることができる。

なお、本発明の好適な実施態様は下記の記載から明瞭となるであろう。

#### 図面の簡単な説明

15 図1は、全てが正常な核酸について核酸の識別方法を実施した場合を示した模式図であり、(A)は本発明方法、(B)は従来方法(ニコラスらの方法)を示す。

図2は、半数が変異した核酸について核酸の識別方法を実施した場合を示した模式図であり、(A)は本発明方法、(B)  
20 は従来方法(ニコラスらの方法)を示す。

図3は、全てが変異した核酸について核酸の識別方法を実施した場合を示した模式図であり、(A)は本発明方法、(B)は従来方法(ニコラスらの方法)を示す。

図4は、本発明の核酸の識別方法による吸光度と試料DNA  
25 中の変異割合との関係を示すグラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明に係る核酸の識別方法は、従来法では標識した標準DNAに非標識の試料DNAを過剰に加え、コンペティティブハイブリダイゼーションするのに対し、これとは逆に  
5 標識した試料DNAに非標識の標準DNAを過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、上記試料DNAと標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することにより、遺伝子領域の不特定の変異の有無のみならず、その変異が対立遺伝子の両方に起きているのか、或  
10 いは一方のみに起きているのかを検出すること、正常細胞中に混在するわずかな変異を検出すると共にその存在比をも測定し得ること、複数の検体間でその特定の対立遺伝子が完全に一致しているか否かを確認することを可能にしたものである。

15 即ち、本発明の核酸の識別方法とニコラスらの方法(Anal. Biochem. 205, 193 (1992) 記載の方法)とを模式図を用いて比較しながら理論的に考察すると、以下の通りである。

図1は全てが正常な遺伝子について検出を行なった場合を  
20 模式的に示したもので、本発明方法は(A)図に示したように、一方に検出可能な標識(D)、他方に固相担体と結合可能な標識(B)を導入した2種の異なるプライマーで、検体中の変異を検出しようとする遺伝子の増幅反応を行なって標識試料DNA1とし、一方同じ塩基配列をもつ非標識のプ  
25 ライマーで該遺伝子の増幅反応を行って非標識標準DNA2

とする。次いで、標識試料DNA1と非標識標準DNA2とを  
1:20の割合で混合変性し、アニーリングすることにより  
コンペティティブハイブリダイゼーションを行なう。これ  
により、一方に検出可能な標識(D)、他方に固相担体と結  
5 合可能な標識(B)を有する核酸が1/21に希釈される(参  
照符号3参照)。次に、この反応生成物を固相担体にトラッ  
プして組み換えの起こっていない元のままの標識試料DNA1  
を測定する(参照符号4参照)。この場合、測定値は理論上  
当初の1/21(0.048)となる。

10 一方、ニコラスらの方法は図1(B)に示したように、非  
標識の試料DNA1'と一方に検出可能な標識(D)、他方に  
固相担体と結合可能な標識(B)を導入した標識標準DNA2'  
とを20:1で混合変性し、アニーリングすることによりコ  
ンペティティブハイブリダイゼーションを行なう(参照符  
15 号3')。次に、その反応生成物を固相担体にトラップして組  
み換えの起こっていない元の状態の標識標準DNA2'を測  
定する(参照符号4')。すると、この場合も本発明方法と同  
様に、コンペティティブハイブリダイゼーションにより標  
識(D),(B)を含む標識標準DNA2'が1/21に希釈され、  
20 測定値は理論上当初の1/21(0.048)となる。

従って、試料中遺伝子の塩基配列と標準DNAの塩基配列  
が全く同じであれば、本発明方法及び従来方法(ニコラス  
法)ともコンペティティブハイブリダイゼーション後の測  
定値は理論上当初の1/21(0.048)となる。

25 次に、試料中遺伝子の一方のみに変異を有する場合は、図

2の模式図に示したようになる。即ち、本発明方法及び従来法（ニコラス法）とも、上記図1の場合と同様の操作により、試料DNA 1,1' と標準DNA 2,2' とを混合変性し（本発明方法1:20、従来法20:1）、アニーリングによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、反応生成物3,3' を固相担体にトラップして組み換えの起こっていない元の状態の標識DNAを測定する（参照符号4,4'）。この場合、本発明方法ではコンペティティブハイブリダイゼーションにより標識(D),(B)を含む合成核酸が42/82に希釈され（参照符号3）、測定値は理論上当初の42/82（0.51）となる。一方、従来法（ニコラス法）ではコンペティティブハイブリダイゼーションにより標識(D),(B)を含む組み換えの起こっていない元の状態の標識DNAが1/11に希釈され、測定値は理論上当初の1/11（0.091）となる。

更に、試料中の遺伝子に変異のあるもののみの場合は、図3(A),(B)に示したように、本発明方法及び従来法（ニコラス法）ともに図1,2の場合と同様の操作により、試料DNA 1,1' と標準DNA 2,2' とを混合変性し（本発明方法1:20、従来法20:1）、アニーリングによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、反応生成物3,3' を固相担体にトラップして組み換えの起こっていない元の状態の標識DNAを測定する（参照符号4,4'）。その結果は、本発明方法及び従来法（ニコラス法）ともコンペティティブハイブリダイゼーションにより標識(D),(B)を含む標識DNAは全く希釈されることなく、測定値は理論上元のままである。

上記変異の割合による組み換えの起こっていない元の状態の標識DNAの測定値の変化をまとめたのが下記表1である。

表 - 1

	理論値（当初の測定値を1としたときの比）		
	全てが正常遺伝子	1/2が変異遺伝子	全てが変異遺伝子
従 来 法	0.048	0.091	1
本 発 明 法	0.048	0.512	1

表1から分かるように、本発明方法では試料中の変異を検出しようとする遺伝子のすべてが正常である場合と、1/2が変異遺伝子である場合と、全てが変異遺伝子の場合とで測定値にそれぞれ約0.5ずつの差があり、明確にこれらを識別することができるが、従来法（ニコラス法）では全てが正常遺伝子の場合と1/2が変異遺伝子の場合との間に測定値の差が0.043しかなくこれらを明確に識別することができない。また、本発明方法によれば、変異遺伝子の存在割合と測定値との間に比例的相関関係を生じることが理論的に認められる。

従って、本発明の核酸の識別方法によれば、正常遺伝子と変異遺伝子との存在比に関係なく変異の有無を検出することができ、また試料中に存在する正常遺伝子と変異遺伝子との比と、コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じる固相担体に結合可能な標識物と検出可能な標識物との両方を持つ分子を定量した測定値との間に比例的相

関関係が得られ、上記測定値から、それらの存在比を比較的容易に算出することができるものであり、更に複数の検体DNAの特定遺伝子に関して、それぞれ試料DNA、標準DNAとすることにより、これら遺伝子の同一性を調べることも可能である。

このように、本発明の核酸の識別方法では、まず検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーを用いて、検体中の目的核酸の特定領域内の遺伝子増幅を行う。

この場合検体としては、ヒトより得られる血液、組織病片等、あるいは糞尿などの排泄物等が挙げられる。更に、出生前診断を行う場合、羊水中に存在する胎児の細胞や試験管中での分裂卵細胞の一部を検体とすることもできる。また、これらの検体は直接又は必要に応じて遠心分離操作等により沈渣として濃縮した後、例えば、酵素処理、熱処理、界面活性剤処理、超音波処理、或いはこれらの組み合わせ等による細胞破壊処理を予め施したものを使用することができ、この場合前記細胞破壊処理は、目的とする組織由来のDNAを顕在化せしめる目的で行なわれるものである。なお、細胞破壊処理の具体的な方法は、PCRプロトコルスアカデミック プレス インク P14、P352 (1990) (PCR PROTOCOLS, Academic Press Inc., P14, P352 (1990))等の文献に記載された公知の方法に従って行なうことができ、また検体中のDNA量はトータル量で1~100  $\mu$ g程度

であることが好ましいが、 $1\ \mu\text{g}$ 以下でも十分増幅可能である。

次に、上記目的核酸増幅用プライマーは、検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を  
5 導入したプライマーとかなるものである。この場合、検出可能な標識又は固相担体に結合可能な部位が導入される位置は、プライマーの伸長反応の効率に大きく影響を与えないところであればよく、好ましくは5'末端付近の水酸基部分、塩基部分或いはリン酸ジエステル部分の活性基が挙げられる。  
10

上記検出可能な標識物としては非放射性、放射性物質のどちらを用いてもよいが、好ましくは非放射性物質が用いられる。非放射性の標識物としては、直接標識可能なものとして蛍光物質 [例えばフルオレッセイン誘導体 (フルオ  
15 レッセインイソチオシアネート等)、ローダミン及びその誘導体 (テトラメチルローダミンイソチオシアネート等)]、化学発光物質 (例えばアクリジン等) や遅延蛍光を発する物質 (DTTA: ファルマ社製) 等が挙げられる。

また、標識物と特異的に結合する物質を利用すれば間接  
20 的に標識物を検出することができる。こうした場合の標識物としては、ビオチン、リガンド、特定の核酸或いは蛋白ハプテン等が挙げられ、ビオチンの場合にはこれに特異的に結合するアビジン或いはストレプトアビジンが、ハプテンの場合にはこれに特異的に結合する抗体が、リガンドの場合  
25 合はレセプターが、特定の核酸或いは蛋白の場合にはこれと



特異的に結合する核酸、核酸結合蛋白或いは特定の蛋白と親和性のある蛋白等が利用できる。

上記ハプテンとしては、2,4-ジニトロフェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンを使うことができ、更にはビオチン或いは蛍光物質等もハプテンとして使用することができる。これらの標識物はいずれも単独又は必要があれば複数種の組み合わせで公知の手段（特開昭59-93099号、特開昭59-148798号、特開昭59-204200号各公報参照）により、導入することができる。なお、検出可能な標識と固相に結合可能な部位とは同一であってもよい。

この目的核酸増幅用プライマーを上記検体に加えることにより、検体中に検出すべき目的核酸が存在すれば、プライマーの伸長反応に基づく遺伝子増幅反応が起こる。

この場合、プライマーの伸長反応は、4種類のヌクレオチド三リン酸（デオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸及びチミジン三リン酸（これらの混合物をdNTPということもある））を基質として該プライマーに取り込ませることにより行なわれる。

この伸長反応を行なう場合、通常核酸鎖を増幅するために上記単位核酸及び核酸伸長酵素を含む増幅反応試薬が用いられ、この場合核酸伸長酵素としてはE.coli DNAポリメラーゼI、E.coli DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼなどの任意のDNAポリメラーゼを用いることができるが、特にTaq DNAポリメラーゼ、Tth

DNA ポリメラーゼ、Vent DNA ポリメラーゼ等の熱安定性DNA ポリメラーゼを用いることが好ましく、これによりプライマーによる標的配列認識の特異性を高め、迅速かつ特異的に遺伝子増幅反応を行なうことができる（詳細は特  
5 開平1-314965号公報及び同1-252300号公報参照）。  
また、この反応を行なう際、反応溶液の水分の蒸発を防止するためにオイルを添加することができる。この場合、このオイルは水と分配可能で、かつ水より比重の軽いものであれば何れのものも使用することができ、具体的にはシリ  
10 コンオイル、ミネラルオイル等が例示される。また、遺伝子増幅装置によっては、このような媒体を必要としないものもあり、このような遺伝子増幅装置を用いてプライマーの伸長反応を行うこともできる。

このように、上記核酸増幅用プライマーを用いて伸長反  
15 応を繰り返すことにより、検体中の核酸を効率的に増幅させることができる。なお、この遺伝子増幅反応を行なう条件等の具体的な方法については、実験医学、羊土社、8, No. 9 (1990)、PCRテクノロジー ストックトン プレス (1989) (PCR Technology, Stockton press (1989)) 等  
20 の文献に記載された公知の方法に従って行なうことができる。

次に、上記遺伝子増幅の結果得られた標識DNAを試料DNAとし、この試料DNAに該試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品を標準DNAとして等モル以上加え、  
25 コンペティティブハイブリダイゼーションを行う。

この場合、上記同一性を識別しようとする非標識の標準 DNA は、試料 DNA と両末端とも等しいものが理想的であるが、必ずしも両末端が完全に等しいものでなくてもよく、後述する実施例 5 では両末端とも 3 base ずつ長さが異なる  
5 試料 DNA と標準 DNA とを用いているが、十分な精度の識別検査が行われている。目安としては、試料 DNA と標準 DNA の鎖長の違いは両末端それぞれ 10 塩基以内程度にとどめるのが好ましいと思われるが、これについては目的とする遺伝子の配列等によって若干異なるものと思われる。

10 このような非標識標準 DNA は、上述した遺伝子の増幅反応に用いたプライマーと同じ塩基配列で非標識のプライマーを用い、正常遺伝子の増幅反応により調製することができる。また、そのようにして増幅した遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌等を利用して大量に調製すること  
15 ともできる。更に、正常遺伝子を多数連結させたものをプラスミドに導入し、大量調製を容易にすることもできる。あるいは、遺伝子増幅を利用しないで天然の遺伝子から酵素的に直接切り出してもよく、また場合によっては化学合成によって調製することも可能である。

20 ここで、非標識標準 DNA を多数連結させたものをプラスミドに導入するためには、増幅に用いる 2 本のプライマーの 5' 側に、標準遺伝子を同一方向に連結させるために用いる制限酵素認識配列、非標識 DNA を切り出すために用いる制限酵素認識配列を導入する。この場合、標準 DNA を同一方  
25 向に連結させる制限酵素認識配列は、非対称配列を切断末

端に残すものが好ましく、さらには 8 塩基を認識する SfiI  
等が好ましい。また、この認識配列は、標準 DNA 中に存在  
しないものを使用しなければならない。一方、標準 DNA を  
切り出すための制限酵素認識配列は、平滑末端を残すもの  
5 が好ましいが、その他の末端を残すものでもよい。また、こ  
の認識配列は標準 DNA 中に存在しないものを選ぶ必要があ  
る。更に、DNA を運搬するベクターとしては、プラスミド、  
ファージ等任意のものを用いればよいが、大量調製等に適  
している pUC118 等の大腸菌内で増幅し得る多コピーのも  
10 のが好ましい。

非標識標準 DNA をこれを導入したプラスミドから切り出  
す具体的方法としては、まず標準 DNA とする配列を、2 本  
のプライマーの 5' 側に標準 DNA を同一方向に連結させる  
ために用いる制限酵素認識配列及び非標識 DNA を切り出す  
15 のに用いる配列を有するプライマーにより増幅し、同一方  
向に連結させるための制限酵素で切断する。これをライゲー  
ションすることにより、標準 DNA が同一方向にいくつも連  
なった構造となる。これをベクターに導入することにより  
同一方向に標準 DNA が連結したプラスミドを得ることがで  
20 きる。このプラスミドを標準 DNA の切り出しに用いる制限  
酵素で処理することにより、標準 DNA を得ることができる。

ここで、連結の数は多い方が好ましいが、プラスミドの  
安定性等の条件により 10 個～数十個が適当と思われ、それ  
に関しては標準 DNA の配列によっても異なる。

25 次いで、本発明では上記方法により予め調製しておいた

非標識標準DNAと標識試料DNAとのコンペティティブハイブリダイゼーションを行う。コンペティティブハイブリダイゼーションの際には、上記両DNAを変性する必要があるが、変性方法は熱による方法あるいはアルカリによる方法が好ましい。また、両DNAを混合する時期は変性直前でもよいし、変性後であってもよい。ここで、本発明方法においては、標識試料DNAに対して非標識標準DNAを当モル以上加える必要があり、通常は5～20倍モル程度に過剰に加えることが好ましいが、DNAの鎖長、塩基配列及び変異の程度等に応じて最適条件は異なる。

更に、コンペティティブハイブリダイゼーションにおいては、溶液中の塩濃度が最適になるように調整する必要がある、それには鎖長によるところが大きい。一般に、ハイブリダイゼーションにおいては、SSC (20XSSC : 3M塩化ナトリウム, 0.3Mクエン酸ナトリウム) やSSPE (20XSSPE : 3.6M塩化ナトリウム, 0.2Mリン酸ナトリウム, 2mM EDTA) が使われており、本法でもこれらの溶液を好適な濃度に希釈して使用することができる。

コンペティティブハイブリダイゼーションは上記の方法で変性した標識試料DNAと非標識標準DNAとを混合し、高温から徐々に温度を下げることにより達成することができる。この場合、温度条件については、ハイブリダイゼーションを行うDNA鎖長や塩基配列及び変異塩基配列と正常塩基配列との違いに応じて適宜最適条件が設定されるが、通常は98～58℃までの範囲で3～10分間に1℃の速度で温

度を下げる条件を目安とすればよい。

次に、コンペティティブハイブリダイゼーション生成物につき、ED-PCR法（特開平1-31496号並びに同1-252300号公報、J.Clin.Microbiol.30,1728（1992）等参照）の原理に基づいて測定を行う。即ち、ED-PCR法においては、二本鎖核酸のそれぞれの鎖にそれぞれ異なる標識（場合によっては同じ標識でもよい）が存在する場合にのみ、その二本鎖核酸の存在をシグナルとして示すことができる。従って、上記コンペティティブハイブリダイゼーション生成物においては、標識試料DNAと非標識標準DNAとの間で鎖間の組み換え頻度が高いほどシグナルは低くなる。つまり、試料中に目的とする領域内において非標識標準DNAと同じ塩基配列を含む割合が多いほどシグナルは低くなる。また、必要に応じて試料DNAの一方の鎖のみに標識を導入し、標準DNAのそれと相補的な鎖に標識を導入しておくことによって、試料中のDNAと標準DNAとの塩基配列が同じ場合に、つまり両DNAの間で組み換えが起こった時にシグナルを発生させることもできる。

このように、上記ハイブリダイゼーション生成物の測定を行い、該測定結果から同一性の識別を行う（変異遺伝子の有無並びにその正常遺伝子に対する存在比又は試料DNA、標準DNA間で塩基配列の相違の有無並びに相違の程度を求める）が、この場合、測定は使用する標識物質に応じて一般的手法を用いればよい。例えば、標識物質がラジオアイソトープであればそのまま活性を測定すればよく、また標

識物質が蛍光性物質であれば、そのまま蛍光光度計を用いて強度を測定すればよい（特開平1-252300号公報参照）。

一方、プライマーに直接検出可能な標識以外の標識を導入した場合には、その標識を間接的に測定するための試薬  
5 が用いられる。この場合、この測定試薬としては、例えば標識がビオチンである場合にはアビジン又はストレプトアビジンと酵素との結合体等が、標識がハプテンである場合にはハプテンと特異的に結合する抗体に酵素を結合させた抗体-酵素結合体、該酵素の基質等が用いられ、これら試  
10 薬を用いることにより該試薬と標識とが反応して、色的又は蛍光的手段により検出可能な成分を得ることができる。なお、これら試薬に用いられる酵素、基質としては、酵素が $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの場合、基質として2-ニトロフェノール、 $\beta$ -D-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェ  
15 リル- $\beta$ -D-ガラクトシド等、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質として3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン尼克アシド、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、1,2-フェニレンジアミン等、酵素がアルカリフォスファターゼの場合、基質として4-メチルウンベリフェリルフォスフ  
20 ェート、NADP、4-ニトロフェニルフォスフェート等、酵素がグルコース-6-リン酸脱水素酵素の場合、基質としてグルコース、NAD等、また酵素がアルコール脱水素酵素である場合、基質としてエタノール、NAD等を用いることができる。

25 なお、上記ハイブリダイゼーション生成物の測定は、該

ハイブリダイゼーション生成物を固相担体にトラップして行われるが、この場合固相担体としては上記プライマーに導入された固相担体結合部位と特異的に結合可能な固相担体5 体が用いられ、具体的には、マイクロタイターウェルに該部位が特異的に結合するように処理したものをを用いることができる。

上記測定の結果、試料中の目的とする遺伝子領域に変異が存在しない場合は、前に図1～図3の模式図を用いて説明したように、過剰の非標識標準DNAで希釈され、測定値は10 著しく低下し、一方変異のある遺伝子のみの場合は非標識標準DNAにより希釈されないため高い測定値が得られる。また、1/2が変異遺伝子である場合（対立遺伝子の一方のみに変異がある場合）には、変異が存在しない場合と変異遺伝子のみの場合との中間の測定値が得られ、従って、この15 ような検体も容易に識別することができる。

更に、予め変異遺伝子と正常遺伝子との存在比が異なる種々の試料DNAについて測定を行い、変異遺伝子と正常遺伝子との存在比と測定値との関係を示す検量線を作成しておくことにより、実際の測定値から試料中の変異遺伝子と20 正常遺伝子との存在比を容易に決定することができる。

また、HLAのタイピングを従来法（PCR-SSO法（Randall, K.ら, Nature, 324, 163（1986））、PCR-RFLP法（Maeda, Nら, Tissue Antigens, 34, 290（1989））、PCR-SSP法（Olerup, Oら, Tissue Antigens, 39, 225（1992））25 で行った場合、試料の対立遺伝子がホモであるとの結果が



出ても、未知のタイプとのヘテロである可能性もあり、正確な判断ができない危険性があった。しかしながら、本法を用いることにより、それがホモであるか否かを結論づけることができる。更に、1つの検体DNAを標識プライマー  
5 で増幅したものを標識試料DNAとし、別の検体DNAを同じ配列を有する非標識プライマーで増幅したものを非標識標準DNAとし、本法に従って分析することにより、2つの検体DNAの対立遺伝子の両方が完全に一致するか否かを判断することが可能となり、移植手術における最終確認法と  
10 して有効な手段となり得る。

次に、本発明の核酸の識別用検査セットは、上記本発明の核酸の識別方法を用いて核酸の同一性を識別する検査を行なうもので、上述したように、目的核酸の特定領域の遺伝子を増幅するための遺伝子増幅用プライマーと、該プライ  
15 マーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識の標準DNAとを具備してなるものである。

ここで、上記目的核酸の特定領域の遺伝子を増幅するための遺伝子増幅用プライマーは、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体と結合可能な部位を導入した  
20 プライマーとから構成されたもので、上記検出可能な標識物及び固相担体と結合可能な部位は、上記本発明の核酸の識別方法で説明したこれらと同様のものであり、また上記非標識の標準DNAも上記本発明方法で説明したものと同様のものである。

25 本発明の核酸の識別用検査セットは、上記本発明の核酸

の識別方法に従って、必要により細胞破壊処理等の前処理を施した検体と上記増幅用プライマーとを混合し、増幅反応試薬を添加して、検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子増幅を行ない、これに上記非標識標準DNAを加えてコンペ  
5 ティティブハイブリダイゼーションを行なった後、得られたハイブリダイゼーション生成物を担体にトラップして、両DNA間での組み換えの度合いを測定するものであり、この場合上記増幅反応試薬及び担体としては公知のもの、具体的には上記本発明の核酸の検出方法で説明したものと同様のものを使用することができ、これらと組み合わせて本発  
10 明の核酸の識別用検査セットとすることができる。

更に、本発明検査セットを用いて核酸の識別検査を行う場合、上記本発明の核酸の識別方法で説明した検体前処理用の細胞破壊試薬、増幅反応生成物を洗浄するための洗浄  
15 液、反応溶液の水分の蒸発を防止するためのオイル及び標識を間接的に測定するための試薬等を用いることができ、これらと組み合わせて本発明の核酸の識別用検査セットとすることもできる。

次に、実施例、比較例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。  
20

#### [実施例1]

ヒトβグロビン遺伝子の6番目のコドンに存在するGlu(GAG) → Val( GTG) の点突然変異の検出を以下のようにして行なった。

25 標的遺伝子としては、下記増幅用プライマーPBG-1、PG

－ 2 で増幅される約 200bp の DNA 断片を用いた。

PBG - 1

5'GGGTTGGCCAATCTACTCCCAG

5 PG - 2

5'CAACTTCATCCACGTTCCACC

PCR法によるDNAの増幅は、下記PBG - 1 - NH<sub>2</sub> (100ng)、  
PG - 2 - NH<sub>2</sub> (100ng) とテンプレートとして下記pBGN  
10 (1ng) 或いは下記pBGM (1ng) とを用い、200 μ M の  
4種のdNTP存在下、100 μ lの67mMトリス－塩酸緩衝  
液(pH8.8)、16.6mM (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、6.7mM MgCl<sub>2</sub>、10mM  
の2－メルカプトエタノール及び2UnitのTth DNAポ  
リメラーゼを含む反応溶液中で行なった。反応は94℃、5分  
15 間加熱後、94℃、30秒、50℃、30秒、72℃、60秒のサイク  
ルで30回繰り返した。この反応溶液を非標識標準DNA溶  
液とした。

一方、下記PBG - 1 - Bio (100ng) に、下記PG - 2  
- DNP (100ng) とpBGN或いはpBGM (1ng) を加え、  
20 200 μ M の4種のdNTP存在下で上記と同様の条件でPCR  
法にて増幅し、標識試料DNA溶液とした。

PBG - 1 - Bio

Biotin - 5'GGGTTGGCCAATCTACTCCCAG

25 PG - 2 - DNP

DNP - 5'CAACTTCATCCACGTTTCACC

PBG - 1 - NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub> - 5'GGGTTGGCCAATCTACTCCCAG

PG - 2 - NH<sub>2</sub>

5 NH<sub>2</sub> - 5'CAACTTCATCCACGTTTCACC

pBGN

正常ヒトβ-グロビン遺伝子を持つプラスミド

pBGM

6番目のアミノ酸に一塩基変異 (Glu (GAG) → Val (GTG))

10 を持つプラスミド

標準DNA溶液及び試料DNA溶液中の増幅物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認し、ほぼ同量生成していることを確認した。

15 コンペティティブハイブリダイゼーション

標準DNA溶液と試料DNA溶液とを混ぜ、水を加え30 μlとした。これに20×SSC (20×SSC: 0.3Mクエン酸ナトリウム、pH7.0、0.3M塩化ナトリウム) 6 μlを加え、ミネラルオイルを重層した。これを98℃、10分間加熱後、  
20 遺伝子増幅装置 (サーマルサイクラーPJ2000, パーキンエルマー社) を用いて1℃/6~10分の速さで58℃まで徐々に温度を下げた。この反応液のうち20 μlを取り、検出に用いた。なお、非標識標準DNA溶液としてpBGNに由来するものを用い、標識試料DNA溶液としてpBGN或いは  
25 pBGMに由来するもの又は両者の等量混合物を用いた。ま

た、非標識標準DNA溶液と標識試料DNA溶液との量比を変えて検討した。

### 検討

上記コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生  
5 じた両鎖の5'末端にビオチンとDNPの両標識を同時に有する分子を検出する。

ストレプトアビジンを固相化したマイクロタイタープレートに抗DNPマウスIgG-アルカリ性フォスファターゼ複合体を含む100  $\mu$ lの50mMトリス塩酸(pH7.5)、0.15M  
10 のNaCl、0.05%のTween20を加える。これにハイブリダイゼーション溶液20  $\mu$ lを加え、混和後、25℃で30分間インキュベートした。これを300  $\mu$ lの同溶液で3回洗った後、4mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸を含む1Mジエタノールアミン(pH9.8)及び0.5mM  $MgCl_2$ を100  
15  $\mu$ l加え、25℃で1時間発色反応を行なった。黄色の発色を405nmの吸光度でプレートリーダーを用いて測定した。なお、ハイブリダイゼーションは、同時に2本のチューブで行ない、その測定結果を平均した。

また、標準DNA溶液、試料DNA溶液の混合比を変えて、  
20 コンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、その結果生じた「一方にDNP、他方にビオチン標識を持つ2本鎖DNA」を検出した。結果を表2に示す。

表 - 2

標準 DNA (非標識)	試料 DNA (標識)	標準 : 試料 比率	吸光度 (A405)
正 常 (pBGN 由来)	正常 (pBGN)	20 : 1	0.120
	正常 (pBGN)		
	変異 (pBGM) 混合	20 : 1	0.418
	変異 (pBGM)	20 : 1	0.988
	正常 (pBGN)	10 : 1	0.202
	正常 (pBGN)		
	変異 (pBGM) 混合	10 : 1	0.511
	変異 (pBGM)	10 : 1	1.068
	正常 (pBGN)	5 : 1	0.369
	正常 (pBGN)		
	変異 (pBGM) 混合	5 : 1	0.631
	変異 (pBGM)	5 : 1	1.150

## 〔比較例〕

従来法により核酸の変異検出を行った。即ち、標識プライマーで調製した標準 DNA 溶液に対して非標識プライマーで調製した過剰量の試料 DNA 溶液を加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行なった（標識 DNA と非標識 DNA とのモル比が 1 : 20 になるように両溶液を混合した）。なお、その他の条件等は実施例 1 と同様とした。結果を表 3 に示す。

表 - 3

標準 DNA	試 料	吸光度 (A405)
正 常 (pBGN)	正 常	0.16
	正常+変異	0.20
	変 異	1.02

表 3 に示したとおり、従来法は正常 DNA と正常 DNA + 変異 DNA との間に吸光度で 0.04 の差しかなく、両者の区別が上記実施例 1 の本発明方法に比べて極めて困難であった。

#### [実施例 2]

10 ヒト c-H-ras 遺伝子の 12 番目のコドンに存在する GGC (Gly) → GTC (Val) の検出を以下のように行なった。この場合、下記の pSK-2 或いは pKY-1 を下記の PHR-1、PHR-2 のプライマーを用いて増幅して得られた変異の位置を含む約 110bp の DNA 断片を実験に用いた。

15 下記プライマー PHR-1-DNP (100ng)、PHR-2-Bio (100ng) を用い、pSK-2 或いは pKY-1 (1ng) をテンプレートとして実施例 1 と同様に増幅反応を行ない、標識試料 DNA 溶液とした。一方、下記のプライマー PHR-1-NH<sub>2</sub>、PHR-2-NH<sub>2</sub> で pSK-2 を増幅して非標識  
20 標準 DNA 溶液を調製した。なお、増幅物はアガロースゲル電気泳動により生成量及び鎖長を確認した。

PHR-1

5'ATGACGGAATATAAGCTGGTG

25 PHR-2

5'CTCTATAGTGGGGTCGTATTTC

PHR - 1 - DNP

DNP - 5'ATGACGGAATATAAGCTGGTG

PHR - 2 - Bio

5 Bio - 5'CTCTATAGTGGGGTCGTATTTC

PHR - 1 - NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub> - 5'ATGACGGAATATAAGCTGGTG

PHR - 2 - NH<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub> - 5'CTCTATAGTGGGGTCGTATTTC

10 pSK - 2

正常 ras 遺伝子を持つプラスミド (T.Sekiya, Gann, 74,794 (1983), JCRB (Japan Cancer Research Resources Bank) より入手可

pKY - 1

15 12 番目のコドンに変異のあるプラスミド (M.H.Kraus and Y.Yuasa, Nature, 303,775 (1983), JCRB (Japan Cancer Research Resources Bank) より入手可

#### コンペティティブハイブリダイゼーション～検出

20 標識試料 DNA 溶液と非標識標準 DNA 溶液とを混合し、水を加えて 30  $\mu$ l としたものに、20  $\times$  SSC を 6  $\mu$ l 加え、実施例 1 と同様に検出を行なった。なお、コンペティティブハイブリダイゼーションは同時に 2 本のチューブで行ない、その結果の平均値を示した。その結果を表 4 に示す。

25



表 - 4

標準DNA溶液	試料DNA溶液	試料：標準 比 率	吸光度 (A405)
正 常 (pSK-2)	正 常	3 : 20	0.122
	正常+異常	3 : 20	0.338
	異 常	3 : 20	0.575

表 2, 4 の結果から、本発明の核酸の識別方法によれば、対立遺伝子の両方が正常な場合、一方に変異が存在する場合、  
 10 両方共に変異が存在する場合で、それぞれ明確に吸光度が変化し、これらを明確に識別し得ることが確認された。これに対し、従来法（ニコラスらの方法）では、上記表 3 に示されているように、対立遺伝子の両方が正常の場合と一方が正常で他方に変異が存在する場合とに明確な差がなく、  
 15 これらを識別することが困難であった。

### [実施例 3]

正常細胞中に特定の遺伝子に変異した細胞が混在する状態のモデルとして、正常 DNA に極微量の変異 DNA（ガン遺伝子）を加え、本発明法により検出可能かどうかについて  
 20 て以下の通り実験した。

正常 DNA としてヒト c-H-ras 遺伝子（pSK-2 から取得）、変異 DNA としてヒト c-H-ras 遺伝子の 12 番目に GGC (Gly) → GTC (Val) の変異が起きたもの（pKY-1 から取得）を用いて、正常 DNA に対して変異 DNA の  
 25 割合が 0 %、5 %、10 %、25 %、50 %、100 % になるよ

うにサンプルを調製した。これらのサンプルに対して PHR - 1 - DNP 並びに PHR - 2 - Bio の 2 種のプライマーを用いて増幅反応を行ない、標識試料 DNA 溶液を調製した。

一方、正常 DNA に対して PHR - 1 - NH<sub>2</sub> 並びに PHR - 2 - NH<sub>2</sub> の 2 種のプライマーを用いて同様に増幅反応を行ない、非標識標準 DNA を調製した。

標識試料 DNA 溶液と非標識標準 DNA 溶液とを溶液中の DNA のモル比が 20 : 1 になるように両溶液を混合し、熱変性後、アニーリングを行ない、実施例 1 と同様に検出を行なった。結果を表 5 に示す。また、正常 DNA に対して変異 DNA の割合が 100 % の場合の吸光度を 1 とし、それぞれの比をグラフに示した。これを図 4 に示す。

表 - 5

正常遺伝子に対する変異 DNA の割合	吸光度 (A405)
0 %	0.045
5 %	0.079
10 %	0.101
25 %	0.146
50 %	0.304
100 %	0.563

表 5 及び図 4 の結果から、正常 DNA に対する変異 DNA の割合が低いものでも吸光度に明確な差が見られ、また変異 DNA の割合と吸光度との間の相関が明らかであり、変異 DNA 存在量が 10 % 程度のもので容易に検出可能である

ことが確認された。従って、DNA 診断により血液、糞尿中の組織から微量のガン細胞を検出する場合でも本法に従い検査すれば、変異DNAを持つ細胞の有無のみならず変異DNAを持つ細胞の存在比も概算することができることが確認された。

#### [実施例 4]

##### 嚢胞性線維症の遺伝子診断

ヒトCFTR遺伝子(Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator gene)は嚢胞性線維症の原因遺伝子とされている。この遺伝子の対立遺伝子両方に異常がある場合にのみ発病し、一方にのみ異常がある場合には本人は発病しないが子孫にその因子が伝わることとなる。従って、CFTRの遺伝子診断のためには、その遺伝子が対立遺伝子の両方に変異を持った場合、一方にのみ変異を持つ場合、両方とも正常な場合を区別する必要がある。

また、この遺伝子にみられる変異のうち約7割は、508番目のフェニルアラニンが欠損したものであるが、それ以外にも多くの種類の変異の存在が報告されており、その位置、種類は多岐にわたり不特定である。

本法が目的とするのは、過去の報告からみて変異の頻度の高い領域に関して、その対立遺伝子の両方ともが正常か、一方にのみ変異が存在するか、あるいは両方とも変異しているかを同定することである。

本実施例においては、下記表6に示した代表的な4種の変異について実験を行なったが、これ以外の変異についても

容易に検出系を作製することは可能である。また、本実施例では各エキソンについて1種類の変異のモデルのみを示したが、増幅物中に本例以外の変異が存在する場合にも検出可能であることはいうまでもない。

表 - 6

exon	変 異 の 種 類
exon4	621 + 1G > T
exon10	Δ F508
exon11	G551D
exon21	N1303K

#### ① エキソン4の検査

エキソン4に存在する代表的な変異は621 + 1G > Tと呼ばれるものである。この変異621 + 1G > Tの検出を下記の通り行った。

#### 試料の調製

ヒト染色体DNAをテンプレートとしてエキソン4の一部を増幅し、下記プラスミド(CF04P101, CF04M101)に組み込んだ。

CF04P101

5'ATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCAGCC

CF04M101

5'TACGATACAGAATATATGTGCCATGGGGCC

PCR法による増幅は、CF04P101-OH (100ng)、CF04M101-OH (100ng) とテンプレートとして正常ヒト染色体1  $\mu$ gを用い、200  $\mu$ Mの4種のdNTP存在下、100  $\mu$ lの67mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.8)、16.6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、6.7mM MgCl<sub>2</sub>、10mMの2-メルカプトエタノール及び2UnitのTth DNAポリメラーゼを含む反応液で行なった。反応は94℃、5分間加熱後、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、60秒のサイクルで35回繰り返した。

反応液をアガロース電気泳動で分離し、約230bpのフラグメントを得た。これをpUC119のSmaI siteに導入した。塩基配列を確認し、pEX4Nとした。

変異遺伝子は上記pEX4Nをテンプレートとし、上記CF04P101、CF04M101及び下記CF04621P、CF04621Mの4種のプライマーを用いてoverlap extension mutagenesis法 (文献、Gene, (1989) 77, 51-59, Steffan N. Ho et al.) により点突然変異を生じさせ、621+1G>Tの遺伝子を得た。塩基配列を確認し、pEX4Mとした。

CF04621P

GATTTATAAGAAGTTAATACTTCCTTGACACAG

CF04621M

AAGTATTAACCTTCTTATAAATCAAACCT

#### 変異遺伝子の検出

非標識標準DNAの調製は以下のように行なった。

CF04P101-NH<sub>2</sub> (100ng) 及び CF04M101-NH<sub>2</sub> (100ng) と上記 pEX4N (1ng) を用い、前記試料の調製で用いたものと同様の反応液組成により PCR 増幅を行なった。

一方、標識試料 DNA は、CF04P101-Bio (100ng)、  
5 CF04M101-DNP (100ng) を用い、

正常：pEX4N 1ng

対立遺伝子の一方が変異：pEX4N 0.5ng

pEX4M 0.5ng

対立遺伝子の両方が変異：pEX4M 1ng

10 をテンプレートとして PCR 増幅を行ない調製した。

標準 DNA 溶液及び試料 DNA 溶液中の増幅物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認し、ほぼ同量生成していることを確認した。

#### コンペティティブハイブリダイゼーション

15 試料 DNA 溶液と 20 倍量の標準 DNA 溶液を実施例 1 の条件で混和し、98℃、10 分加熱後、1℃/10 分の速度で 68℃まで徐々に温度を下げた。この反応液のうち 20 μl を取り、コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じた両鎖の 5' 端にビオチンと DNP の両標識を同時に有する  
20 分子を実施例 1 と同様の操作により検出した。その結果を表 7 に示す。

表 - 7

標準DNA溶液 (非標識)	試料DNA溶液 (標識)	吸光度 (A405)
5 正 常 (pEX4N由来)	正常 (pEX4N)	0.11
	正常 (pEX4N) 変異 (pEX4M) 混合	0.70
	変異 (pEX4M)	1.87

表7に示したように、対立遺伝子の両方が正常な場合、一方のみ変異している場合、両方とも変異している場合をそれぞれ明確に区別することができた。

## ② エキソン10の検査

エキソン10に関しては、最も高い頻度で出現するΔF508をモデルとして、下記の通り検査を行った。

### 試料の調製

15 下記CF10P101-OH (100ng), CF10M101-OH (100ng) とヒト染色体DNA (1 μg) を用い、前述の方法でPCR増幅を行なったものを同様の方法でプラスミドに導入し、正常遺伝子を有するpEX10Nを得た。

20 CF10P101 -

5'GATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGG

CF10M101 -

5'CTTCTAGTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC

25 一方、上記CF10P101-OH, CF10M101-OHと下記

CF  $\Delta$  F508U, CF  $\Delta$  F508L との 4 種のプライマー及び pEX10N をテンプレートとして overlap extension mutagenesis 法により、 $\Delta$  F508 変異を有するプラスミド pEX10M を得た。

5

CF  $\Delta$  F508U

5' AAATATCATCGGTGTTTCCTATGA

CF  $\Delta$  F508L

5' CACCGATGATATTTTCTTTAATG

10

#### 遺伝子変異の検出

標識試料 DNA は、CF10P101 - Bio (100ng)、CF10M101 - DNP (100ng) をプライマーとし、

正常 : pEX10N 1ng

15 対立遺伝子の一方が変異 : pEX10N 0.5ng

pEX10M 0.5ng

対立遺伝子の両方が変異 : pEX10M 1ng

をテンプレートとして PCR 増幅を行なうことにより調製した。

20 非標識標準 DNA は、CF10P101 - NH<sub>2</sub> (100ng), CF10M101 - NH<sub>2</sub> (1ng) 及び pEX10N (1ng) を用い、PCR 増幅により調製した。

上記エキソン 4 に関するものと同様の操作を行ない、試料 DNA を分析した結果を表 8 に示す。表 8 に示されているよ

25 うに、3 種の遺伝子型を明確に区別することができた。



表 - 8

標準 DNA 溶液 (非標識)	試料 DNA 溶液 (標識)	吸光度 (A405)
5      正      常 (pEX10N 由来)	正常 (pEX10N)	0.14
	正常 (pEX10N) 変異 (pEX10M) 混合	0.89
	変異 (pEX10M)	1.74

## ③ エキソン 11 の 検 査

エキソン 11 に関しては、G551D をモデルとした。

## 10    試 料 の 調 製

下記 CF11P101 - OH (100ng), CF11M101 - OH (100ng) 及びヒト染色体 DNA (1  $\mu$ g) を用い、エキソン 4 の場合と同様の方法で PCR 増幅を行なったものを同様の方法でプラスミドに導入し、正常遺伝子を有するプラスミド pEX11N  
15    を得た。

CF11P101 -

5'GAAGGAAGATGTGCCTTTCAAATTCAGATTG

CF11M101 -

20    5'ATGACATTTACAGCAAATGCTTGCTAGACC

一方、上記 CF11P101 - OH, CF11M101 - OH と下記 CF11 - 551P - OH, CF11 - 551M - OH との 4 種のプライマー及び pEX11N をテンプレートとして overlap extention  
25    mutagenesis 法により、G551D 変異を持つプラスミド

pEX11Mを得た。

CF11 - 551P -

5'CACTGAGTGGAGATCAACGAGCAAGAATTTCT

5 CF11 - 551M -

5'GCTCGTTGATCTCCACTCAGTGTGATTC

#### 遺伝子変異の検出

非標識標準DNAは、CF11P101 - NH<sub>2</sub> (100ng), CFM101  
10 - NH<sub>2</sub> (100ng) 及び pEX11N (1ng) を用い、PCR増幅により調製した。

標識試料DNAは、CF11P101 - Bio (100ng)、CFM101 - DNP (100ng) 及び

正常 : pEX11N 1ng

15 対立遺伝子の一方が変異 : pEX11N 0.5ng

pEX11M 0.5ng

対立遺伝子の両方が変異 : pEX11M 1ng

をテンプレートとしてPCR増幅により得た。

得られた非標識標準DNA及び標識試料DNAを用い、エ  
20 キソン4に関するものと同様にして、遺伝子変異の検出を行なった。その結果を表9に示す。表9に示されているように、3種の遺伝子型を明確に区別することができた。

表 - 9

標準 DNA 溶液 (非標識)	試料 DNA 溶液 (標識)	吸光度 (A405)
正 常 (pEX11N 由来)	正常 (pEX11N)	0.08
	正常 (pEX11N) 変異 (pEX11M) 混合	0.48
	変異 (pEX11M)	0.90

## ④ エキソン 21 の 検 査

エキソン 21 に関しては、N1303K の変異をモデルとし  
た。

下記 CF21P101 - OH (100ng), CF21M101 - OH (100ng)  
及びヒト染色体 DNA (1  $\mu$ g) を用い前述の方法に従い、正  
常遺伝子を有するプラスミド pEX21N を得た。

CF21P101 -

5'AGAGAACTTGATGGTAAGTACATGGGTGTT

CF21M101 -

5'TTAGCAGCCTTACCTCATCTGCAACTTTCC

一方、上記 CF21P101 - OH, CF21M101 - OH 及び下  
記 CF21 - 1303P - OH, CF21 - 1303M - OH の 4 種の  
プライマー及び pEX21N をテンプレートとして overlap  
extention mutagenesis 法により、N1303K 変異を  
持つプラスミド pEX21M を得た。

CF21 - 1303P -

5'CATTTAGAAAAAAGTTGGATCCCTATGAACA

CF21 - 1303M -

5'GGGATCCAACTTTTTTCTAAATGTTCCAG

5

#### 遺伝子変異の検出

非標識標準DNAは、CF21P101 - NH<sub>2</sub> (100ng)、CF21M101 - NH<sub>2</sub> (100ng) 及び pEX21N (1ng) を用い、PCR 増幅により得た。

10 標識試料DNAは、CF21P101 - Bio (100ng)、CF21M101 - DNP (100ng) 及び

正常 : pEX21N 1ng

対立遺伝子の一方が変異 : pEX21N 0.5ng

pEX21M 0.5ng

15 対立遺伝子の両方が変異 : pEX21M 1ng

をテンプレートとしてPCR増幅により調製した。

得られた非標識標準DNA及び標識試料DNAを用い、エキソン4に関するものと同様に、遺伝子変異の検出を行った。その結果を表10に示す。表10に示されているよ

20 うに、3種の遺伝子型を明確に区別することができた。

25

表 - 10

標準 DNA 溶液 (非標識)	試料 DNA 溶液 (標識)	吸光度 (A405)
正 常 (pEX21N 由来)	正常 (pEX21N)	0.20
	正常 (pEX21N) 変異 (pEX21M) 混合	0.51
	変異 (pEX21M)	1.16

## [実施例 5]

本法では、エキソン 10 の一部をタンデムに連結したプラスミドを作製し、それを制限酵素で切断することにより非標識標準 DNA を得、この非標識標準 DNA を用いて遺伝子の変異検出を行った。なおこの場合、非標識 DNA の配列は標識 DNA と完全には同一でなく、下記のように、非標識 DNA の方がそれぞれの 5' 末端に<sup>5'</sup>CCT<sup>3'</sup> の配列を余分に有している。

20 非標識標準 DNA の作製法及びそれを用いた実験

エキソン 10 を用いて、非標識標準 DNA をプラスミドに組み込み大量調製する実験を行なった。

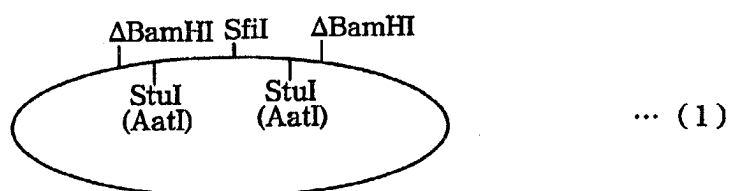
## ① pUC - Sfi / Stu の調製

5' - OH - GATCAGGCCTAAAAGGCCT

と

5' - OH - GATCAGGCCTTTTAGGCCT

との両オリゴヌクレオチド各5pmolをアニーリングし、これをpCU119をBamHIで切断したもの(100ng)に挿入し、下記制限酵素地図(1)で表されるpUC-Sfi/Stuを得た。



#### 10 ② pUC-Sfi/Stu-EX10の調製

下記CF-10-LigU(100ng), CF-10-LigL(100ng)を用い、pEX10N(1ng)をテンプレートとしてPCR増幅を行なった。SfiIで切断後、アガロースゲル電気泳動により約190bpの断片を回収した。これをSfi切断した上記

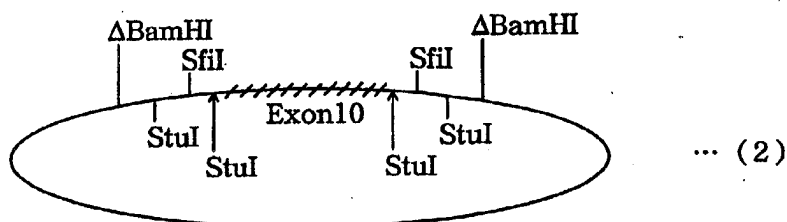
15 pUC-Sfi/Stuに導入し、塩基配列を確認し、下記制限酵素地図(2)で表されるpUC-Sfi/Stu-EX10を得た。

CF-10-LigU

20 5'OH-TTTAGGCCTAAAAGGCCTGATTATGGGAGAACTGGA

CF-10-LigL

5'OH-CCCAGGCCTTTTAGGCCTCTTCTAGTTGGCATGCTT

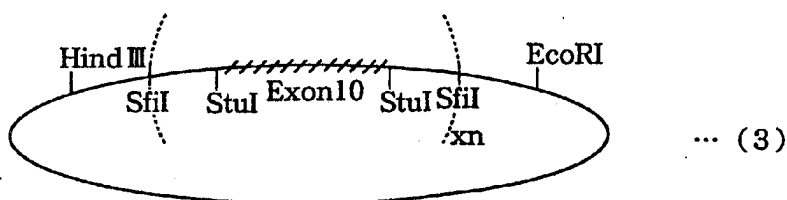


5

### ③ pUC - EX10Lig の調製

pUC - Sfi/Stu - EX10 300 μg を SfiI で切断し、約 190bp の断片をアガロースゲル電気泳動により精製した。  
 このフラグメント 2 μg と SfiI 切断した pUC - Sfi/Stu10ng をリゲイション (Ligation) し、大腸菌 DH5 を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製し、エキソン 10 を含むフラグメントが約 15 ヶ同じ向きに連結した下記制限酵素地図 (3) で表される pUC - EX10Lig を得た。このプラスミドを StuI (AatI) で切断することにより、エキソン 10 を含む断片を切り出した。

15



20

### pUC - EX10Lig を非標識標準 DNA として用いる遺伝子変異検出法

標識試料 DNA は、CF10P101 - Bio (100ng)、CF10M101 - DNP (100ng) を用い、テンプレートとして、

25

正常 : pEX10N 1ng

対立遺伝子の一方に変異 : pEX10N 0.5ng

pEX10M 0.5ng

対立遺伝子の両方に変異 : pEX10M 1ng

5 を用い PCR 法により調製した。

非標識標準 DNA は、下記 (a) ~ (d) を用いた。

(a) CF10P101-NH<sub>2</sub> (100ng)、CF10M101-NH<sub>2</sub> (100ng) 及びテンプレートとして pEX10N (1ng) を用い、PCR 法により調製した。

10 (b) pUC-EX10Lig を StuI (AatI) で切断したもの (上記制限酵素地図 (3) 参照) を精製せずに用いたもの。

(c) pUC-EX10Lig を StuI (AatI) で切断したもの (上記制限酵素地図 (3) 参照) をアガロースゲル電気泳動で分離し、エキソン 10 を含む断片を精製したもの。

15 (d) pUC-EX10Lig を EcoRI-Hind III で切断したもの (上記制限酵素地図 (3) 参照)。

上記各非標識標準 DNA 及び標識試料 DNA を用い、上記実施例 4 と同様にして、遺伝子変異の検出を行なった。その結果を表 11 に示す。



表 - 11

試料DNA非識	標準DNA（非標識）調製法			
	a	b	c	d
正常（pEX10N由来）	0.07	0.14	0.15	0.84
正常（pEX10N） 変異（pEX10M）混合	0.28	0.38	0.33	0.81
変異（pEX10M）	0.74	0.86	0.72	0.78

表11に示したように、(b),(c)の方法で調製した標準DNAは、(a)のPCR法により調製したものと同等の結果を与えた。一方、(d)のものは、タンデムにつながった状態のままのものであり、コンペティションはほとんどみられない。

以上のことは、プラスミド上にタンデムに連結したものから制限酵素により非標識標準DNAを調製することが十分可能であることを示している。また、非標識標準DNAは精製することなく使用可能であり、更に標識DNAと非標識DNAの配列が完全に同一でなく、両端に余分な配列を持つものでも十分に使用可能であることを示している。

以上実施例1～5から、本発明の核酸の識別方法によれば、正常遺伝子及びその変異遺伝子の有無並びに両者の比を検体から直接、短時間で検出することができることが確認された。従って、従来困難とされていたある特定遺伝子内に存在する不特定な位置の変異の有無の検出、正常細胞中に混在する変異遺伝子を持った少量の異常細胞の検出、複数

の試料中の特定遺伝子の同一性を調べることで可能となり、遺伝病の診断あるいはガンのDNA診断等に対する本発明識別方法の果たす役割は極めて大である。

5

10

15

20

25

## 請求の範囲

1. 検体中の目的核酸の特定領域内の遺伝子を識別するに当  
たり、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担  
5 体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的  
核酸増幅用のプライマーを用いて、検体中の目的核酸の特  
定領域の遺伝子増幅を行ない、その結果得られた標識DNA  
を試料DNAとすると共に、試料DNAとの同一性を識別し  
たい非標識のDNA標品を標準DNAとし、上記試料DNA  
10 に上記標準DNAを等モル以上加え、コンペティティブハイ  
ブリダイゼーションを行なった後、上記検出可能な標識物  
と固相担体に結合可能な部位とを利用して上記試料DNAと  
上記標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定す  
ることによって、核酸の同一性を識別することを特徴とす  
15 る核酸の識別方法。

2. 試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品  
が1組のプライマーを用いた遺伝子増幅法（PCR法）によ  
り調製されたものである請求の範囲第1項記載の識別方法。

3. 試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品  
20 が宿主細胞内で増殖可能なベクターを用いた遺伝子工学的  
手法により調製されたものである請求の範囲第1項記載の識  
別方法。

4. 検体中の目的核酸の特定領域が嚢胞性線維症の原因遺伝  
子（CFTR遺伝子）である請求の範囲第1項乃至第3項の  
25 いずれか1項に記載の識別方法。

5. 検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーと、

該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を  
5 識別したい非標識DNA標品とを具備してなることを特徴とする核酸の識別用検査セット。

6. 検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子を増幅するための試薬と、

ハイブリダイゼーション生成物をトラップするための担体  
10 と、

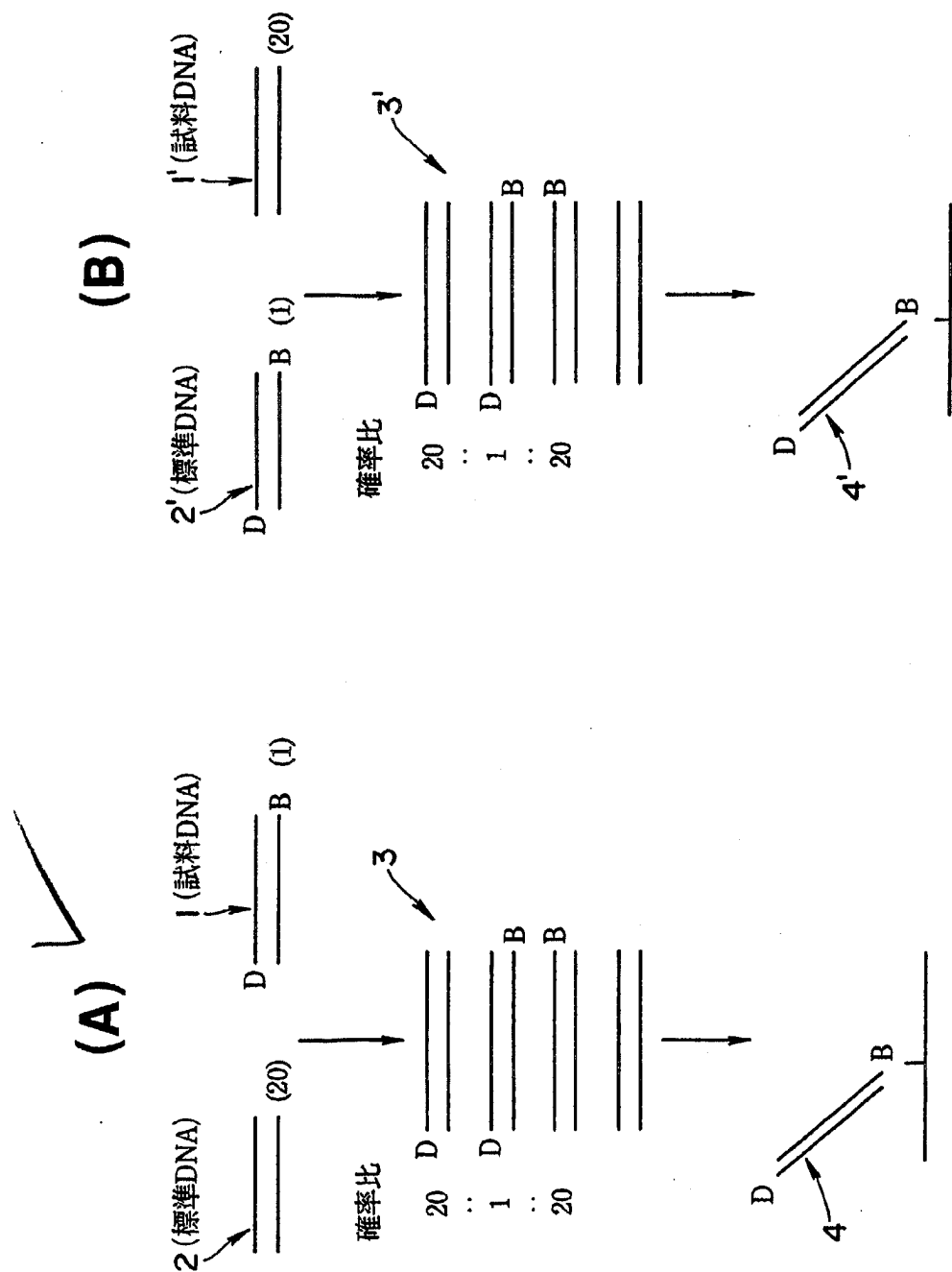
トラップされた遺伝子を検出するための試薬とを具備した請求の範囲第5項に記載の核酸の識別用検査セット。

15

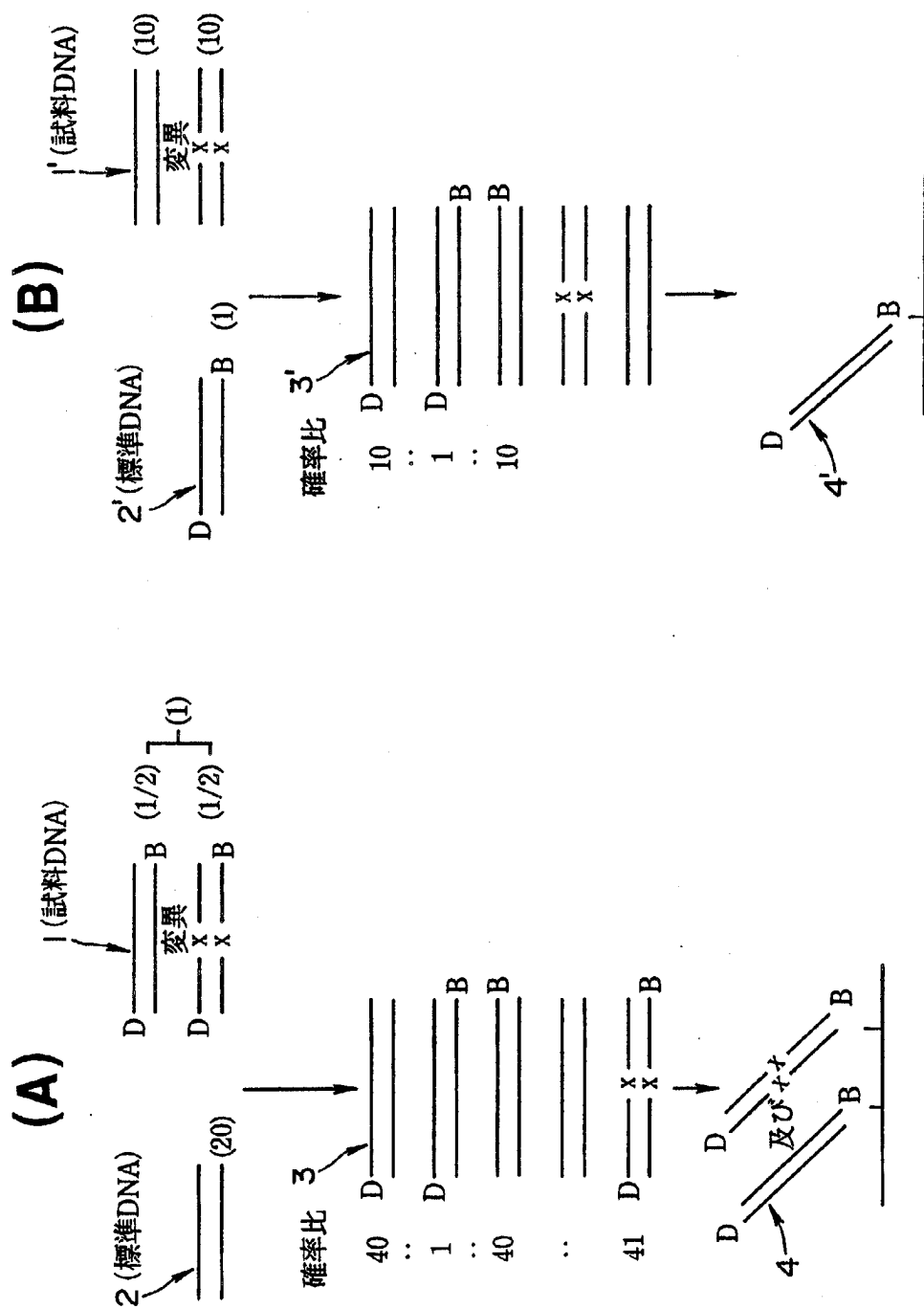
20

25

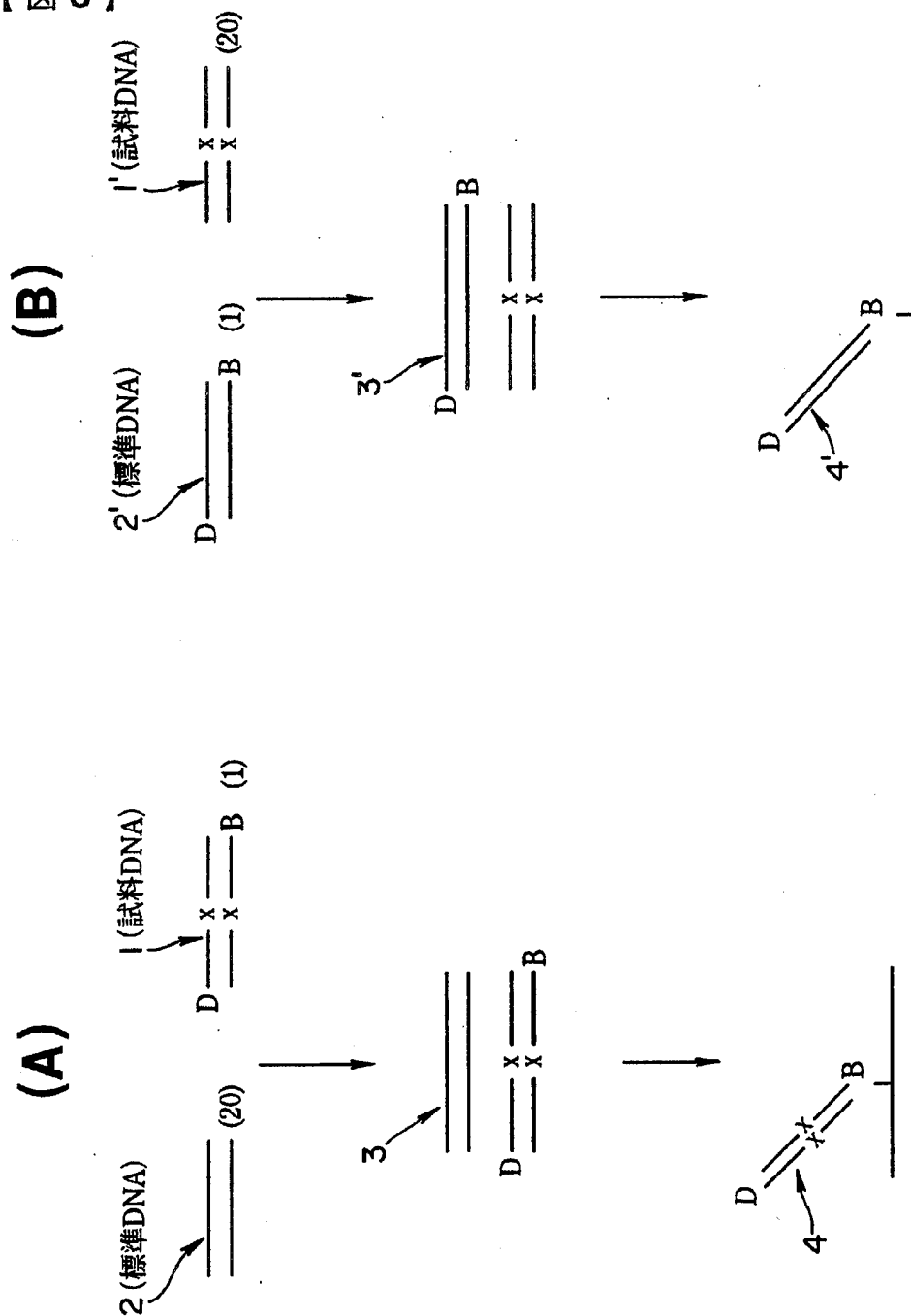
【圖 1】



【図 2】

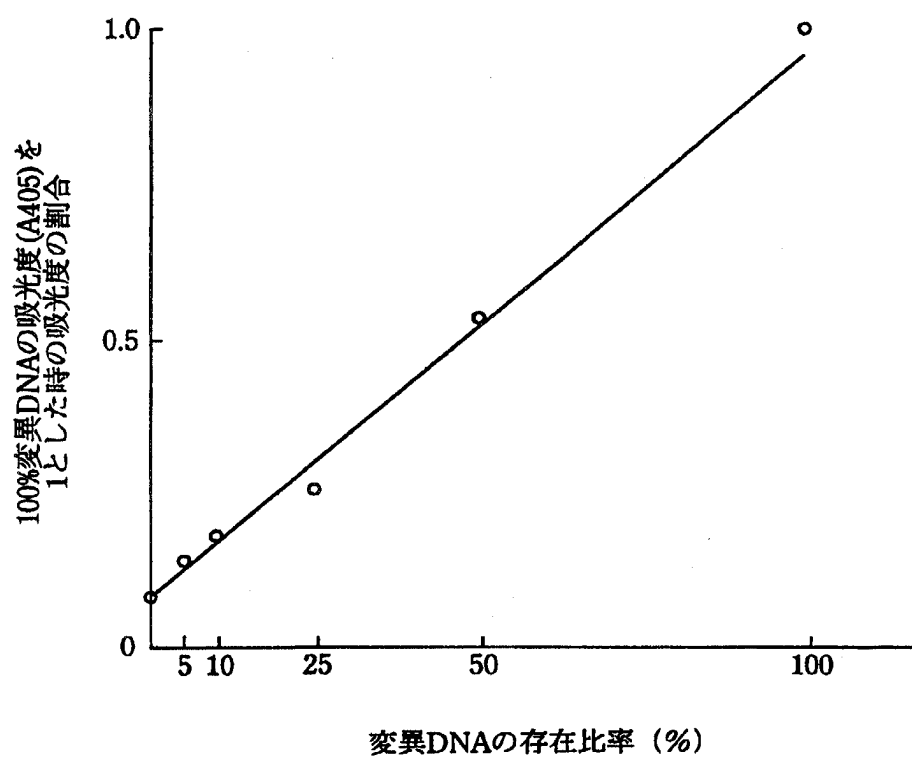


【図 3】



4/4

【 図 4 】





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01106

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>5</sup> C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Analytical Biochemistry, Vol. 205, (1992) J. C. Ncolas et al. "Quantitative and Qualitative Analysis of Amplified DNA Sequences by a Competitive Hybridization Assay" P. 193-199	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 31, 1994 (31. 08. 94)

Date of mailing of the international search report

September 20, 1994 (20. 09. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>6</sup> C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>6</sup> C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Analytical Biochemistry, 第205巻, (1992) J. C. Nicolas et al. 「Quantitative and Qualitative Analysis of Amplified DNA Sequences by a Competitive Hybridization Assay」 p. 193-199	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日以後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
31.08.94	20.09.94	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 平田和男 ㊞	4 B 7 8 2 3
	電話番号 03-3581-1101 内線	3448



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

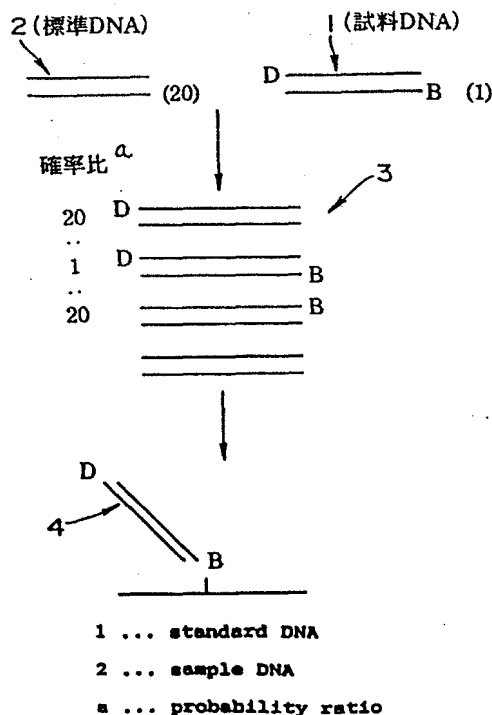
(51) 国際特許分類 6 C12Q 1/68		A1	(11) 国際公開番号 WO 95/02068
		(43) 国際公開日 1995年1月19日(19.01.95)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01106 (22) 国際出願日 1994年7月7日(07. 07. 94) (30) 優先権データ 特願平5/194196 1993年7月9日(09. 07. 93) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 湧永製薬株式会社 (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区伏見町4丁目2番14号 Osaka, (JP) (72) 発明者;および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 岡 孝紀(OKA, Takanori)(JP/JP) 松永裕也(MATSUNAGA, Hironari)(JP/JP) 山根明男(YAMANE, Akio)(JP/JP) 〒739-11 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 Hiroshima, (JP) (74) 代理人 弁理士 小島隆司(KOJIMA, Takashi) 〒104 東京都中央区銀座2丁目13番19号 銀座森澤ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title METHOD OF DISCRIMINATING NUCLEIC ACID AND TESTING SET FOR DISCRIMINATING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称 核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セット

(57) Abstract

A method of discriminating nucleic acids by examining the presence or absence of variant genes in a nucleic acid, the ratio of normal genes to variant genes, or the identity among specified genes present in various samples, which method comprises amplifying a specified region of a target nucleic acid present in a specimen by the polymerase chain reaction using a primer bearing a detectable marker and a primer bearing a site capable of binding to a solid-phase carrier, conducting competitive hybridization by adding the resultant nucleic acid as a marker sample DNA in at least an equimolar amount to a non-marker standard DNA of which the identity with the sample DNA is to be discriminated, and then measuring the marker intensity of the product of hybridization. A testing set for discriminating nucleic acids according to the above method comprises a primer to be used for amplifying a target nucleic acid and comprising a primer bearing a detectable marker and a primer bearing a site capable of binding to a solid-phase carrier, and a non-marker standard DNA of which the identity with a gene amplified by the amplifying primer is to be discriminated.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01106

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>5</sup> C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Analytical Biochemistry, Vol. 205, (1992) J. C. Ncolas et al. "Quantitative and Qualitative Analysis of Amplified DNA Sequences by a Competitive Hybridization Assay" P. 193-199	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 31, 1994 (31. 08. 94)

Date of mailing of the international search report

September 20, 1994 (20. 09. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>6</sup> C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>5</sup> C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Analytical Biochemistry, 第205巻, (1992) J. C. Ncolas et al. 「Quantitative and Qualitative Analysis of Amplified DNA Sequences by a Competitive Hybridization Assay」 p. 193-199	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
31.08.94	20.09.94	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 平田和男 ㊞	4 B 7 8 2 3
	電話番号 03-3581-1101 内線	3448